

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平6-306096

(43) 公開日 平成6年(1994)11月1日

(51) Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 K 5/10	Z N A			
7/06		Z 8318-4H		
// A 6 1 K 37/02	A D U	8314-4C		
C 0 7 K 99: 00				

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 13 頁)

(21) 出願番号	特願平6-9893	(71) 出願人	000005201 富士写真フイルム株式会社 神奈川県南足柄市中沼210番地
(22) 出願日	平成6年(1994)1月31日	(72) 発明者	森 英登 神奈川県南足柄市中沼210番地 富士写真 フイルム株式会社内
(31) 優先権主張番号	特願平5-38677	(72) 発明者	駒澤 宏幸 埼玉県朝霞市泉水3丁目11番46号 富士写 真フイルム株式会社内
(32) 優先日	平5(1993)2月26日	(72) 発明者	小島 政芳 神奈川県南足柄市中沼210番地 富士写真 フイルム株式会社内
(33) 優先権主張国	日本 (J P)	(74) 代理人	弁理士 中村 稔 (外6名) 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ペプチド誘導体及びその用途

(57) 【要約】

【目的】 細胞接着性蛋白質様の活性を保持しており、簡便な手段で合成可能であり、血液中での安定性の高い新規なペプチド誘導体を提供する。

【構成】 下記式 (I) で表される配列を構成単位として有するペプチドと適当な有機分子が共有結合してなる化合物であって、1分子内に定まった複数個の式 (I) で表される配列を含んでいることを特徴とするペプチド誘導体またはその薬学上許容できる塩有効成分として含有してなる、ガン転移抑制剤。

Arg-Gly-Asp 式 (I)

1

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記式(1)で表される配列を構成単位として有するペプチドと適当な有機分子が共有結合してなる化合物であって、1分子内に定まった複数の式(1)で表される配列を含んでいることを特徴とするペプチド誘導体またはその薬学上許容できる塩。

Arg-Gly-Asp 式(1)

【請求項2】 式(1)で表される配列を構成単位として有するペプチドと有機分子の結合様式が、アミド結合、イミド結合、ウレタン結合、尿素結合のなかの少なくとも1種である請求項1に記載のペプチド誘導体またはその薬学上許容できる塩。

【請求項3】 式(1)で表される配列を構成単位として有するペプチドと共有結合を形成する有機分子が、アミノ基と反応して請求項2に記載の共有結合を形成するような官能基を1分子中に2個以上6個以下有する分子である、請求項1及び2に記載のペプチド誘導体またはその薬学上許容できる塩。

【請求項4】 式(1)で表される配列を構成単位として有するペプチドと共有結合を形成する有機分子が、2価以上6価以下の有機酸またはその活性誘導体である請求項3に記載のペプチド誘導体またはその薬学上許容できる塩。

【請求項5】 式(1)で表される配列を構成単位として有するペプチドと共有結合を形成する有機分子が、テトラヒドロフランテトラカルボン酸またはその活性誘導体である請求項4に記載のペプチド誘導体またはその薬学上許容できる塩。

【請求項6】 式(1)で表される配列を構成単位として有するペプチドと共有結合を形成する有機分子が、トリメシン酸またはその活性誘導体である請求項4に記載のペプチド誘導体またはその薬学上許容できる塩。

【請求項7】 薬学上許容できる賦形剤及び請求項1～6のいずれかに記載のペプチド誘導体またはその薬学上許容できる塩を有効成分として含有してなる、ガン転移抑制剤。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は特定の構成を有するペプチドの誘導体に関するものであり、より詳しくは細胞接着性蛋白質であるフィブロネクチンの接着コア配列ペプチドの誘導体またはその薬学上許容可能な塩、及びその用途に関するものである。

【0002】

【従来技術】 フィブロネクチン、ラミニン、ピトロネクチン等は細胞と結合組織との結合に関与し、また動物細胞の細胞機能に関連した種々の生物活性を有する蛋白質であり、細胞接着性蛋白質と総称される。例えばフィブロネクチンは肝臓で生成され、ヒト血漿中に約0.3 mg/mlの濃度で存在する糖蛋白質である。

2

【0003】 フィブロネクチンはその1次構造が分子クローニングを用いて決定されており(Koornblit, A. R. et al., EMBO Journal, 4巻, 2519 (1985))、分子量約250KのポリペプチドであるA鎖と約240KのB鎖がC末端付近でジスルフィド結合した2量体蛋白質であることが明らかにされている。またラミニンについても佐々木ら(Sasaki, M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 81巻, 935 (1987), Sasaki, M. et al., J. Biol. Chem., 262巻, 17111 (1987))によりその1次構造が決定されている。ラミニンはA、B1、B2とよばれる3本のポリペプチド鎖から構成されており、十字架状の構造をとっていることが知られている。

【0004】 そして細胞接着性に関与する結合部位の研究も行われ、フィブロネクチンの細胞接着部のコア配列はArg-Gly-Asp (RGD)なるトリペプチドであることが1984年に報告された(Pierschbacher, M. D. et al., Nature 309巻, 30(1984))。またラミニンの細胞接着部位のコア配列はTyr-Ile-Gly-Ser-Arg (YIGSR)で表されるペンタペプチドであることも解明されている(Graf, J. et al., Cell 48巻, 989 (1987))。

【0005】 これらフィブロネクチンやラミニンは、上記コア配列を介して細胞のレセプターと結合することにより各種の情報を細胞に伝達し、またヘパリン、コラーゲン、フィブリン等の生体高分子とも結合して細胞と結合組織との接着、細胞の分化、増殖に関与しているものと考えられている。

【0006】 このように細胞接着性蛋白質は多様な生物活性を有するため、その活性部位配列ペプチドを用いた研究が精力的になされている。例えばフィブロネクチンの細胞結合部のコア配列の利用としては、ポリマーにRGD配列を有するペプチドを共有結合させ、人工臓器用基体や動物細胞培養用基体として用いる方法(特開平1-309682号公報、特開平1-305960号公報、W0 90/05036 A特許)、RGD配列を有するペプチドに疎水性領域を連結することにより目的とするペプチドを固体表面に付着させ、歯科用埋め込み剤や組織培養基体を利用する方法(W0 90/11297A特許)、RGD配列を有する種々の環状及び鎖状オリゴペプチドまたはその類縁体を用いて血小板凝集を阻害する方法あるいは血栓症を予防、治療する方法(高分子学会予稿集第38巻, 3149 (1989)、特開平2-174797号公報、特開平3-11830号公報、特開平3-118331号公報、特開平3-118398号公報、特開平3-118397号公報、特開平3-118333号公報、W0 91/01331特許、W0 91/07429特許、W0 91/15515特許、W0 92/00995特許)、RGDペプチドとヒアルロン酸を共有結合した化合物を用いて血小板凝集を調節する方法(特開平4-134096号公報)、RGD配列を有するペプチドを細胞移動抑制剤として用いる方法(特開平2-4716号公報)、RGD配列を有するペプチドを固定化した膜を細胞接着膜として用い

る方法（高分子学会予稿集第37巻、705（1988））、RGDS配列を有するポリペプチドを体外血液用血小板保護剤として用いる方法（特開昭64-6217号公報）、ポリペプチド分子内に細胞接着活性を有するペプチドを付加することにより人工機能性ポリペプチドとして利用する方法（特開平3-34996号公報）等が開示されている。

【0007】更に近年、細胞接着性蛋白質はガン転移に関与する生体分子としても注目されてきている。ガン転移の一連の段階では、ガン細胞は種々の宿主細胞や生体高分子と接触する。このときフィブロネクチンやラミニンのような細胞接着性分子が存在すると該細胞は多細胞塊を形成し、ガン細胞の増殖や生存がより容易になる。ところが、たとえばフィブロネクチンの接着部位コア配列であるトリペプチドRGDが共存すると、競争的にガン細胞上のフィブロネクチンレセプターと結合するため細胞接着がブロックされ、ガン転移阻害作用を示すことが報告されている（Science 238巻、467（1986））。

【0008】しかしながらRGDペプチドはそれ単独では細胞接着活性が充分でないため、効果の増強をはかる目的で該配列を有するオリゴペプチド、環状オリゴペプチド、あるいはその繰返し配列を有するポリペプチドを用いてガン転移を制御する方法（Int. J. Biol. Macromol., 11巻、23（1989）、同誌、11巻、226（1989）、Jpn. J. Cancer Res., 60巻、722、（1989）、特開平2-174798号公報）、あるいは腫瘍再発を防止する方法（特開平2-240020号公報）が試みられている。またフィブロネクチン分子中の細胞接着ポリペプチドとヘパリン結合ポリペプチドを構成単位とするポリペプチドを用いてガン転移を抑制する方法（特開平3-127742号公報）も報告されている。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】上述のようにフィブロネクチン等の細胞接着性蛋白質の活性部位コア配列は様々な生物活性を保持しているため、その応用価値は高いものと考えられる。しかしながら該コア配列の細胞接着活性が充分でないため、それらのガン転移抑制作用は実際の医療に应用するためには満足できるものではなかった。また一般に薬物が生体に投与されたのち薬効を維持するためには、それ自体の生物活性の強さのみならず薬物の生体内での安定性（例えば血流中での滞留時間や排泄される時間など）が重要であることが知られている。細胞接着性蛋白質の活性部位コア配列ペプチドも例外ではなく、それ単独ではペプチド類に特有の速い代謝分解や排泄が起こり、結果的に所望の効果が期待できない場合も生ずる。そこで生体内での安定性を向上させるため従来技術の項で説明したような種々の方法が報告されているが、それらの化合物のなかには未だ生物活性が不十分であったり、合成が困難なものも多い。またポリエチレングリコール（PEG）等の高分子と該コア配列を連結する方法や、該コア配列を繰返すことにより高分子量

化を行う方法も知られているが、これらの方法では目的物の構造や分子量を特定して合成を行うことは極めて困難であり、この点で更に有効な物質の開発が必要とされていた。そこで本発明者らは細胞接着性蛋白質であるフィブロネクチンの持つ種々の生物活性を充分に保持し、合成も容易でかつ血液中での安定性の高い新規な化合物を求めて鋭意検討を行った結果、公知のフィブロネクチンコア配列ペプチド誘導体に比べてガン転移抑制能が大きく、さらに簡便な手段で合成可能な新規なペプチド誘導体を見出し、本発明を完成するに至った。従って本発明の目的は、細胞接着性蛋白質様の活性を充分に保持しており、簡便な手段で合成可能であり、血液中での安定性の高い新規なペプチド誘導体を提供することにある。本発明はさらにガン転移阻害活性の高い新規なペプチド誘導体を提供することを目的とする。本発明はさらに上記ペプチド誘導体を含有してなる薬物組成物の提供も目的とする。

【0010】

【課題を解決する手段】上記課題は、下記式（I）で表される配列を構成単位として有するペプチドと適当な有機分子が共有結合してなる化合物であって、1分子内に定まった複数の式（I）で表される配列を含んでいることを特徴とするペプチド誘導体またはその薬学上許容できる塩を見出したことにより達成された。

Arg-Gly-Asp 式（I）

ここでArg、Gly、Aspは、アルギニン、グリシン、アスパラギン酸残基をそれぞれ表す。これらのアミノ酸（グリシン残基は除く）はD-体、L-体、ラセミ体のいずれでもよいが、好ましくはL-体である。

【0011】本発明において使用されるペプチド配列は、ペプチド鎖中あるいはその末端にArg-Gly-Asp配列を構成単位として有するオリゴペプチドであって、その残基数は7残基以下であるものが望ましい。またペプチド鎖のカルボキシ末端側は任意にアミド化されていてもよい。具体的なペプチドとしては、以下に示すオリゴペプチドを挙げることができる。

Arg-Gly-Asp-Thr

Arg-Gly-Asp-Ser

Arg-Gly-Asp-Val

Gly-Arg-Gly-Asp-Ser

Asp-Arg-Gly-Asp-Ser

Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-Ala

【0012】本発明において、式（I）で表される配列を構成単位として有するペプチドを有機分子と共有結合するのは、有効なペプチドの周辺を修飾することにより、生体内酵素による分解から保護したり、また高分子量にして徐放効果を付与するためである。式（I）で表される配列を構成単位として有するペプチドと有機分子の結合様式としては、アミド結合、イミド結合、ウレタ

ン結合、尿素結合のなかの少なくとも1種を挙げることができる。なおここでアミド結合とはカルボアミド、スルホンアミド、ホスホンアミドのいずれをも意味する。本発明のため使用することの可能な有機分子としては、薬学的に許容されるものであり、有用な生物活性を減ずることなく、分子全体の水溶性を妨げず、さらに式

(I) で表される配列を構成単位として有するペプチド中のアミノ基と反応して上記共有結合を形成しうような官能基を、1分子中に2個以上の定数個、好ましくは2個以上6個以下有するものであれば、目的に応じて使い分けることができる。つまり本発明のペプチド誘導体は、1分子中に定まった複数個の式(I)で表される配列を有することになる。従っていわゆるポリマー類とは異なり、分子構造は明確であることが特徴である。

【0013】本発明において用いられる具体的な有機分子としては、まず価数が2~6価の有機酸、より具体的には多価カルボン酸を挙げることができる。多価カルボン酸の価数としては上述の通り2~6価であることが好ましく、また芳香族系、脂肪族系多価カルボン酸いずれをも用いることが可能である。具体的な多価カルボン酸としては、トリメシン酸(1,3,5-ベンゼントリカルボン酸)、テレフタル酸、テトラヒドロフランテトラカルボン酸、ピロメリット酸(1,2,4,5-ベンゼンテトラカルボン酸)、1,4,5,8-ナフタレンテトラカルボン酸、アジピン酸(ヘキサン2酸)、クエン酸、リンゴ酸、1,2,3-プロパントリカルボン酸等が挙げられる。多価カルボン酸とペプチド中のアミノ基を反応させる方法としては、ジシクロヘキシルカルボジイミド等の縮合剤を用いる方法も挙げられるが、多価カルボン酸を活性アシル誘導体に変換ののち縮合する方法が実用的かつ有利である。活性アシル誘導体としては酸ハロゲン化物、より好ましくは酸塩化物が挙げられる。多価カルボン酸の相当する酸塩化物への変換は公知の方法により行うことができるが、市販品を購入することも可能である。

【0014】本発明において用いられる他の有機分子としては、多価スルホン酸を挙げることができる。多価スルホン酸の価数としては2~6価であることが好ましい。また芳香族系、脂肪族系多価スルホン酸いずれをも用いることが可能であるが、2価または3価の芳香族スルホン酸を用いることが特に好ましい。具体的な多価スルホン酸としては、1,3-ベンゼンジスルホン酸、1,5-ナフタレンジスルホン酸等が挙げられる。これらの多価スルホン酸とペプチド中のアミノ基を反応させてスルホンアミド結合を形成する方法としては、活性誘導体であるスルホニルクロライド等に変換ののち縮合する方法が実用的かつ有利である。多価スルホン酸の相当するスルホニルクロライドへの変換は公知の方法により行うことができるが、市販品を購入して利用することも勿論可能である。

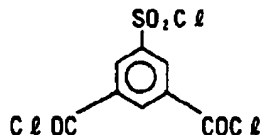
【0015】また本発明において用いられる他の有機分

子としては、多価イソシアナート、イソチオシアナート類を挙げることができる。イソシアナート、イソチオシアナート類は、イソシアン酸及びイソチオシアン酸の活性誘導体ともみなすことができる分子である。多価イソシアナート、イソチオシアナートの価数としては2~6価であることが好ましい。また芳香族系、脂肪族系多価スルホン酸いずれをも用いることが可能であるが、2価の脂肪族イソシアナート、イソチオシアナートを用いることが特に好ましくまた現実的である。具体的にこのような条件を満たすイソシアナート、イソチオシアナートとしては、ヘキサメチレンジイソシアナート等を挙げることができる。多価イソシアナート、イソチオシアナート類の合成法としては、相当する多価アミンとホスゲン(条件によってはホスゲンダイマー)あるいは二硫化炭素を反応させる方法等により合成することができる。イソシアナート、イソチオシアナート類の合成法としては、新実験化学講座14、有機化合物の合成と反応(II) P.1490~1509に詳述されている。

【0016】さらに本発明において好ましく用いることの可能な他の有機分子として、式(I)で表される配列を構成単位として有するペプチド中のアミノ基と反応して共有結合を形成しうような異なった種類の官能基を、一分子中に2個以上の定数個有するようなものも挙げることができる。このような担体としては、以下に示すような多官能性化合物が挙げられる。

【0017】

【化1】



【0018】 $O=C=N-(CH_2)_n-COCl$

上記式中、nは例えば2~5の整数である。

【0019】以上説明してきた中でも、トリメシン酸(1,3,5-ベンゼントリカルボン酸)及びテトラヒドロフランテトラカルボン酸が、式(I)で表される配列を構成単位として有するペプチドと共有結合を形成する有機分子として最も好ましい。

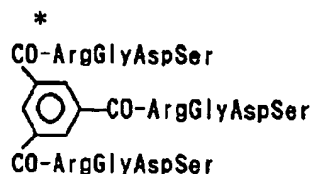
【0020】本発明のペプチド誘導体中に存在するイオン性基は適当な対イオンと塩を形成していてもよい。塩の状態でも本発明の化合物はその生物学的活性を十分に維持する。ただしその塩は生理学的、薬学的に許容されるものであることが必要である。具体的には塩酸塩、硫酸塩、硝酸塩、リン酸塩のような無機酸との塩、酢酸塩、乳酸塩、酒石酸塩等の有機酸との塩、さらにナトリウム塩、カリウム塩などが挙げられるが、なかでも塩酸塩、酢酸塩、ナトリウム塩が特に好ましい。そのような塩への変換は慣用手段により行うことができる。

【0021】以下に好ましい本発明の化合物の具体例を

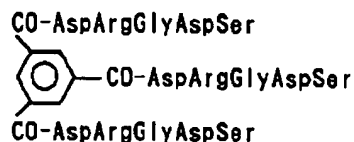
示すが、本発明はこれらに限定されるものではない。  
【0022】

\* 【化2】

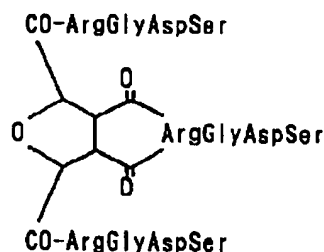
化合物 1



化合物 2



化合物 3



【0023】次に本発明の化合物の合成法について説明する。本発明のペプチド誘導体は種々の方法でこれを合成することができるが、まず保護ペプチド部を合成ののちアミノ末端側の保護基を除去し、これをアミノ基と反応して請求項2に記載の共有結合を形成しうるような官能基を1分子中に2個以上の定数個、好ましくは2個以上6個以下有する有機分子と反応せしめ、しかるのちに保護基を除去することにより合成する方法が実用的かつ有利である。ペプチド部の合成方法としては特に限定しないが、固相法及び固相法を利用したペプチド自動合成装置による合成法がまず挙げられる。固相法及び固相法を利用したペプチド自動合成装置による合成法に関しては、生化学実験講座・タンパク質の化学IV p. 207（日本生化学会編、東京化学同人）、続生化学実験講座・タンパク質の化学（下） p. 641（日本生化学会編、東京化学同人）等に記載されている。

【0024】また本発明の化合物のペプチド部は液相法によって合成することも可能である。すなわちC末端成分となる保護アミノ酸から出発し、C末端を保護あるいは修飾のちアミノ末端保護基を除去し、以下保護アミノ酸を逐次縮合する方法である。またフラグメント縮合を行う方法も有効である。保護アミノ酸あるいは保護ペプチドを縮合する方法としては、公知の方法、例えば泉屋信夫ら編「ペプチド合成の基礎と実験」(丸善)に記載の方法のなかから適宜選択することができる。縮合反応には種々の方法が知られているが、1-ヒドロキシベン

ゾトリアゾールとDCCを用いるDCC-Additive法、あるいはカルボニルジイミダゾールを用いる縮合法が最も良い結果を与えた。

【0025】以上の方法により合成した保護ペプチドのアミノ末端保護基を除去し、これを先に説明した有機分子と反応せしめ、しかるのちに保護基の除去を行う。保護基の除去の条件は用いている保護基の種類に依存する。通常用いられる方法は、加水素分解、HF処理、トリフルオロメタンスルホン酸／チオアニソール／ $\eta$ -クレゾール／トリフルオロ酢酸混合系処理等であるが、保護基の種類によってはさらにさまざまな方法も可能であることは言うまでもない。目的とするペプチド誘導体は脱保護のち公知の方法、例えばイオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーなどで精製することができる。

40 【0026】つぎに本発明のペプチド誘導体の作用及び用途について説明する。本発明のペプチド誘導体は1分子中にArg-Gly-Asp (RGD) 配列を複数個有し、さらにある程度の大きい分子量を有するため酵素分解や代謝によって排泄されにくく、そのため顕著なガン転移阻害活性を示す。本発明のペプチド誘導体は悪性細胞上のフィブロネクチン受容体に多点で作用し、フィブロネクチンへの結合を阻害することにより悪性細胞の接着、コロニー化、破壊的浸食を阻止する。本発明のペプチド誘導体は乳癌、表皮癌、筋線メラノーマ (muscle  
50 line melanoma)、表皮線神経芽細胞腫xグリオマ (epi

dermal line neuroblastoma x glioma)、軟骨細胞、フィブロザルコーマを含め種々の細胞の接着及び転移を阻止するのに有効である。

【0027】さらに本発明のペプチド誘導体は創傷治療作用等の広範な生物活性が認められた。また本発明のペプチド誘導体はマウスを用いて毒性試験を行ったところ、毒性は全く認められなかった。

【0028】本発明のペプチド誘導体またはその薬学上許容可能な塩は、ペプチド系医薬に一般に使用されている投与方法によって使用することができ、通常賦形剤を含む薬物組成物として投与される。この薬物組成物はレミントンの薬科学 (Remington's Pharmaceutical Sciences, Merck, 16, (1980)) に開示されているように、知られているどのような方法で製造してもよい。賦形剤としては蒸留水、生理食塩水、リン酸塩あるいは酢酸塩のような緩衝塩類を含有する緩衝液、浸透圧調節剤としての塩化ナトリウムやショ糖、もしくはアスコルビン酸のような酸化防止剤、または許容し得るこれらの組合せがある。

【0029】このような薬物組成物は溶液、錠剤のような種々の形態とすることができる。投与形態としては経口、経鼻、非経口（静脈注射、皮下注射、腹腔内投与など）等のなかから適宜選択することができる。例えば生理食塩水に溶解して注射用製剤としてもよく、あるいは0.1規定程度の酢酸緩衝液に溶解したのち凍結乾燥剤としてもよい。またリポソーム中に内包したマイクロカプセル剤あるいはミクロスフェア等の形態で利用することも可能である。

【0030】また本発明のペプチド誘導体は他の薬理作用を有する化合物、より具体的には抗ガン性化合物と併用して使用することも可能であり、これらは本発明の範囲に属するものである。本発明のペプチド誘導体と併用して使用することの可能な抗ガン性化合物としては、ガン化学療法において通常用いられる公知の制ガン剤のな

かから適宜選択することが可能であるが、具体的にはアドリアマイシンやシスプラチン、マイトマイシン等が挙げられる。一般に従来の化学療法においては、制ガン剤の副作用による危険性は避けられない問題であることが知られている。それゆえ本発明のペプチド誘導体との併用投与により制ガン剤の投与量を減らし、制ガン剤による副作用を軽減することは非常に有用であると思われる。またこれはガン転移抑制効果をより向上させることをも意味する。

【0031】本発明のペプチド誘導体の投与量は、患者の体重に対し通常1日当たり0.2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ から200  $\text{mg}/\text{kg}$ の範囲であるが、患者の年齢、体重、症状、投与方法によって決定されるものである。

【0032】

【実施例】以下実施例によって本発明を更に詳細に説明する。なお通常用いられる溶媒や試薬、保護基の表記には以下の略号を使用した。

【0033】Boc : t-ブトキシカルボニル  
Bn : ベンジル  
AcOEt : 酢酸エチル  
Mts : メシチレンスルホニル  
HOBt : 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール  
DCC : ジシクロヘキシルカルボジイミド  
iPr<sub>2</sub>NEt : ジイソプロピルエチルアミン  
DMF : ジメチルホルムアミド  
CDI : カルボニルジイミダゾール  
TFA : トリフルオロ酢酸  
TFMSA : トリフルオロメタンスルホン酸

【0034】実施例1 化合物1の合成

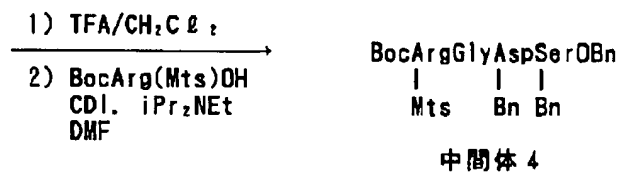
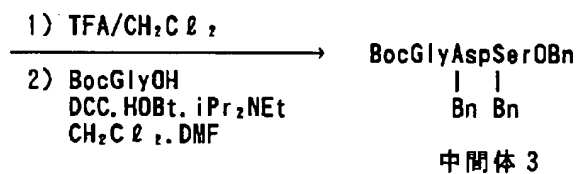
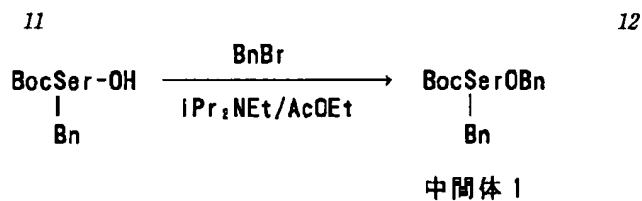
化合物1の液相法による合成法について詳細に説明する。化合物1の合成経路を以下に示す。

【0035】

【化3】

(7)

特開平6-306096

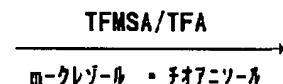
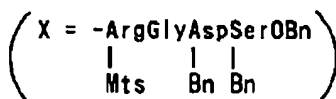
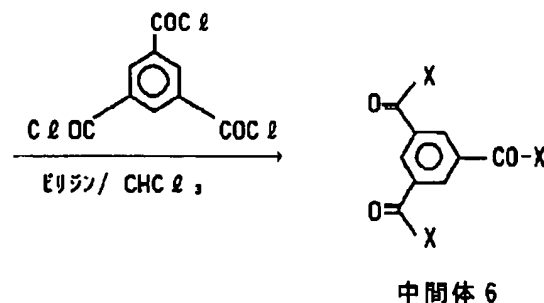
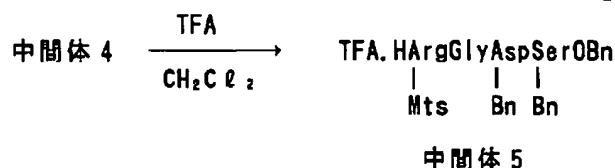


【0036】

【化4】

13

14



## 化合物 1

## 【0037】1) 中間体1の合成

Boc-Ser(Bn)-OH (20.4 g, 69 mmol)、ベンジブロミド (13 g, 76 mmol)、ジイソプロピルエチルアミン (9.8 g, 76 mmol)を酢酸エチル (100 ml)に溶解し、反応混合物を5時間加熱還流した。室温まで放冷した後生成した塩を濾過して除き、濾液を水、1 M クエン酸溶液、飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄、無水硫酸ナトリウムで乾燥のち減圧濃縮して中間体1を無色油状物として得た。このものは精製することなく次の反応に用いた。

## 【0038】2) 中間体2の合成

前項記載の方法により得た中間体1の塩化メチレン (80 ml) 溶液にトリフルオロ酢酸 (80 ml) を加え、反応混合物を室温で40分間攪拌した。反応終了後減圧濃縮して大部分の溶媒を留去し、残渣を酢酸エチルで希釈し、飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄、無水硫酸ナトリウムで乾燥のち減圧濃縮してアミン体を無色油状物として得た。得られたアミン体とBoc-Asp(Bn)-OH (22.6 g, 70 mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (10.7 g, 70 mmol)をDMF (80 ml) 及び塩化メチレン (80 ml)の混合溶媒に溶解し、氷冷しながらDCC (14.4 g, 70 mmol) を加えた。反応混合物を氷冷下2時間、更に室温まで昇温しながら終夜攪拌した後、セライト濾過して生成した沈殿を除去した。濾液を適当量の酢酸エチルで希釈し、水、5 % 炭酸ナトリウム溶液、1 M クエン酸溶液、飽和食塩水で洗浄、無水硫酸ナトリウムで乾燥のち減圧濃縮し

て油状物を得た。シリカゲルカラムクロマトグラフィで精製 (溶出液: ヘキサン/酢酸エチル=4/1) し、目的とする中間体2を無色結晶として35.8 g (3段階で収率87 %) 得た。

## 30 【0039】3) 中間体3の合成

中間体2 (35.7 g, 60.5 mmol) の塩化メチレン (100 ml) 溶液にトリフルオロ酢酸 (100 ml) を加え、反応混合物を室温で40分間攪拌した。反応終了後溶媒を留去し、残渣をエーテルから結晶化させてトリフルオロ酢酸塩32.5 gを得た。得られたトリフルオロ酢酸塩 (18.9 g, 31.3 mmol) とBoc-Gly-OH (5.75 g, 3mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (5.04 g, 33 mmol)、ジイソプロピルエチルアミン (4.45 g, 34.4 mmol) をDMF (20 ml) 及び塩化メチレン (50 ml)の混合溶媒に溶解し、氷冷しながらDCC (6.8 g, 33 mmol) を加えた。反応混合物を氷冷下2時間、更に室温まで昇温しながら終夜攪拌した後、セライト濾過して生成した沈殿を除去した。濾液を適当量の酢酸エチルで希釈し、水、5 % 炭酸ナトリウム溶液、1 M クエン酸溶液、飽和食塩水で洗浄、無水硫酸ナトリウムで乾燥のち減圧濃縮して無色固形物を得た。このものをヘキサン/酢酸エチル (2/1) から再結晶して中間体3を17.9 g (87 %) 得た。

## 【0040】4) 中間体4の合成

中間体3 (17.9 g, 27 mmol) の塩化メチレン (60 ml) 溶液にトリフルオロ酢酸 (60 ml) を加え、反応混合物を



15

室温で1時間撹拌した。反応終了後溶媒を留去し、残渣をエーテルから結晶化させてトリフルオロ酢酸塩15.9 gを得た。一方Boc-Arg(Mts)-OH (4.56 g, 10 mmol)をDMF (20 ml)に溶解し、このものに氷冷しながらCDI (1.63 g, 10 mmol)のDMF (10 ml)溶液を加えた。反応混合物を氷冷しながら1時間撹拌したのち、上記操作により得られたトリフルオロ酢酸塩 (6.61 g, 10 mmol)とジイソプロピルエチルアミン (1.42 g, 11 mmol)のDMF (20 ml)溶液を加えた。反応混合物を氷冷下2時間、更に室温まで昇温しながら終夜撹拌した後、減圧下溶媒を留去した。残渣を適当量のクロロホルムで希釈し、水、5 % 炭酸ナトリウム溶液、1 M クエン酸溶液、飽和食塩水で洗浄、無水硫酸ナトリウムで乾燥のち減圧濃縮した。残渣をエーテルから結晶化させて目的とする中間体4を無色結晶として9.8 g (定量的)得た。

FAB-MS: (M+H)<sup>+</sup> 986.

## 【0041】5) 中間体5の合成

中間体4 (5.5 g, 5.6 mmol)の塩化メチレン (20 ml)溶液にトリフルオロ酢酸 (20 ml)を加え、反応混合物を室温で1時間撹拌した。反応終了後溶媒を留去し、残渣をエーテルから結晶化させて中間体5を5.3 g (94.7 %)得た。

## 【0042】6) 中間体6の合成

中間体5 (2.26 g, 2.3 mmol)をピリジン (3 ml)及びクロロホルム (20 ml)からなる混合溶媒に溶解し、こ\*

16

\*のものにトリメシン酸クロライド (200 mg, 0.75 mmol)のクロロホルム (2 ml)溶液を加えた。反応混合物を室温に終夜放置したのち減圧下溶媒を留去した。残渣を適当量のクロロホルムで希釈し、水、5 % 炭酸ナトリウム溶液、1 M クエン酸溶液、飽和食塩水で洗浄、無水硫酸ナトリウムで乾燥のち減圧濃縮した。残渣をエーテルから結晶化させて中間体6を1.97g (93 %)得た。

FAB-MS: (M+H)<sup>+</sup> 2812.

## 【0043】7) 化合物1の合成

10 中間体6 (1.9 g, 0.68 mmol)のトリフルオロ酢酸 (15 ml)溶液に、トリフルオロメタンスルホン酸 (6 g)、チオアニソール (4 ml)、*m*-クレゾール (3.5 l)、トリフルオロ酢酸 (18 ml)からなる混合溶液を氷冷しながら加え、反応混合物を氷冷下2時間撹拌した。反応液をエーテル (700 ml)に滴下して30分間ゆっくり撹拌した。沈殿した粗生成物を少量の水にとかし、イオン交換クロマトグラフィー (アンバーライトIRA-400、対イオンCl<sup>-</sup>)にかけて精製、凍結乾燥して目的とする化合物1を無色粉末として870 mg (88 %)得た。

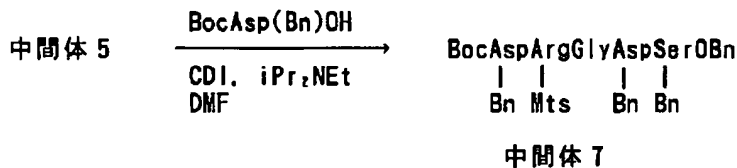
FAB-MS: (M+H)<sup>+</sup> 1456.

## 【0044】実施例2 化合物2の合成

化合物2の合成経路の概略を以下に示す。

## 【0045】

## 【化5】



## → → 化合物2

## 【0046】1) 中間体7の合成

Boc-Asp(Bn)-OH (970 mg, 3.0 mmol)のDMF (10 ml)溶液に、氷冷しながらCDI (490 mg, 3.0 mmol)のDMF (10 ml)溶液を加えた。反応混合物を氷冷しながら1時間撹拌したのち、実施例1の中間体5 (3.0 g, 3.0 mmol)とジイソプロピルエチルアミン (450 mg, 3.5 mmol)のDMF (20 ml)溶液を加えた。反応混合物を氷冷下2時間、更に室温まで昇温しながら終夜撹拌した後、減圧下溶媒を留去した。残渣を適当量のクロロホルムで希釈し、水、5 % 炭酸ナトリウム溶液、1 M クエン酸溶液、飽和食塩水で洗浄、無水硫酸ナトリウムで乾燥のち減圧濃縮した。残渣をエーテルから結晶化させて目的とする中間体7を無色粉末として3.33g (93 %)得た。

FAB-MS: (M+H)<sup>+</sup> 1191.

## 【0047】2) 化合物2の合成

以下実施例1に記載の方法に従い、中間体7のN末端Boc基を除去したのちトリメシン酸クロライドと反応させた。すべての保護基をトリフルオロメタンスルホン酸/チオアニソール/*m*-クレゾール/トリフルオロ酢酸混合系処理により除去、イオン交換クロマトグラフィーにより精製し、目的とする化合物2を無色粉末として得た。

FAB-MS: (M+H)<sup>+</sup> 1801. (M+Na)<sup>+</sup> 1823.

## 【0048】実施例3 化合物3の合成

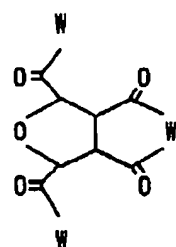
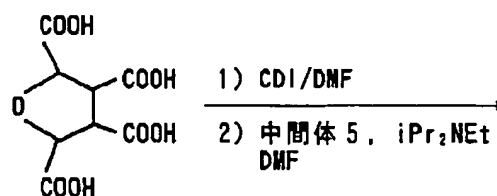
化合物3の合成経路の概略を以下に示す。

## 【0049】

## 【化6】

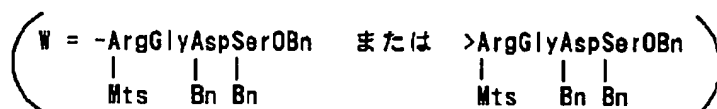
17

18



化合物 3

中間体 8



## 【0050】1) 中間体8の合成

テトラヒドロフランテトラカルボン酸 (250 mg, 1.0 mmol) のDMF (10 ml) 溶液に、氷冷しながらCDI (650 mg, 4.0 mmol) のDMF (10 ml) 溶液を加えた。反応混合物を氷冷しながら1時間撹拌したのち、実施例1の中間体5 (3.0 g, 3.0 mmol) とジイソプロピルエチルアミン (450 g, 3.5 mmol) のDMF (20 ml) 溶液を加えた。反応混合物を氷冷下2時間、更に室温まで昇温しながら終夜撹拌した後、減圧下溶媒を留去した。残渣を適量量のクロロホルムで希釈し、水、5%炭酸ナトリウム溶液、1 M クエン酸溶液、飽和食塩水で洗浄、無水硫酸ナトリウムで乾燥のち減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製 (溶出液: 酢酸エチル/メタノール=10/1) し、目的とする中間体8を無色粉末として1.21 g (43%) 得た。

FAB-MS: (M+H)<sup>+</sup> 2832.

## 【0051】2) 化合物3の合成

以下実施例1に記載の方法に従い、すべての保護基をトリフルオロメタンスルホン酸/チオアニソール/π-クレ

表1

ゾール/トリフルオロ酢酸混合系処理により除去した。イオン交換クロマトグラフィーにより精製し、目的とする化合物3を無色粉末として得た。

FAB-MS: (M+H)<sup>+</sup> 1476, (M+Na)<sup>+</sup> 1498.

【0052】実施例4 メラノーマ細胞を用いた実験的肺転移モデル系によるガン転移阻害作用に関する検討  
本発明のペプチド誘導体のガン転移抑制作用について、実験的肺転移モデル系によって検討した。実施例に記載した本発明の化合物1~3、比較例としてフィブロネクチンの接着コア配列ペプチドであるArg-Gly-Asp-Serを用いた。これらのペプチド各々1000 μgと非常に転移性の強いガン細胞であるB16-BL6メラノーマ細胞 (対数増殖期のもの5 × 10<sup>4</sup> 個) を各々PBS中で混合し、これを1群5匹のC57BL/6の雌マウスに尾静脈注射により投与した。投与後14日目にマウスを屠殺、解剖し、肺に転移したガンのコロニー数を計測して対照のPBS投与群と比較した。その結果を以下の表1に示す。

【0053】

【表1】

投与化合物	肺への転移数	
	平均±SD	(範囲)
PBS (未処理)	24±9	(11-36)
化合物1	8±6	(0-14)*
化合物2	3±2	(1-6)**
化合物3	7±2	(5-10)*

19

Arg-Gly-Asp-Ser

25±2

20

(23-29)

\* t-検定で未処理区と比較して P(0.01

\*\* P(0.001

【0054】この結果によれば、本発明の化合物1から3の投与によって肺へのガン転移は有意に抑制された。これに対し従来から知られているフィブロネクチンの接着コア配列ペプチドであるArg-Gly-Asp-Serは、マウス1匹あたり1000  $\mu$ gの投与量では転移抑制効果を示さなかった。

【0055】実施例5 メラノーマ細胞を用いた自然肺転移モデル系によるガン転移阻害作用の検討  
本発明の化合物のガン転移抑制作用について、より現実的な病態治療モデルである自然肺転移抑制試験により検討した。本発明の化合物1～3と、比較化合物としてフ\*

表2

投与化合物	肺への転移数	
	平均±SD	(範囲)
PBS (未処理)	61±22	(25-103)
Arg-Gly-Asp-Ser	67±13	(53-88)
化合物1	24±13	(5-43)*
化合物2	27±7	(16-37)*
化合物3	21±16	(6-53)**

\* t-検定で未処理区と比較して P(0.01

\*\* P(0.001

【0057】この結果によれば、本発明の化合物1～3の投与によって、現実的な病態治療モデルである自然肺転移抑制試験においてもガンの転移数は有意に抑制された。これに対し従来から知られているフィブロネクチンの接着コア配列ペプチドであるArg-Gly-Asp-Serには、ガン転移の抑制効果は全くなかった。これは本発明の重要な目的の1つである、修飾による活性の増強が目論見通り達成されていることを示している。従って本発明のペプチド誘導体のガン転移抑制効果、及びその有用性、優位性は明白である。

【0058】実施例6 リンパ腫細胞を用いた実験的転移モデル系による癌転移阻害作用に関する検討

表3

投与化合物	肝臓の重量	
	平均±SD	脾臓の重量 平均±SD
PBS (未処理)	4.67±0.50	0.23±0.03
Arg-Gly-Asp-Ser	4.11±0.72	0.25±0.03
化合物1	1.98±0.98***	0.15±0.06***
化合物2	1.37±0.37***	0.11±0.03***
化合物3	1.40±0.31***	0.11±0.02***

\*フィブロネクチンの接着コア配列ペプチドであるArg-Gly-Asp-Serを用いた。1群7匹のC57BL/6の雌マウスを用い、これらの右足かかと部分にB16-BL6メラノーマ細胞(対数増殖期のもの $5 \times 10^4/50 \mu$ l)を移植した。移植後14、16、18、20、22、24、26日目に被試験化合物を尾静脈注射により投与した(1回あたり100  $\mu$ g/200  $\mu$ l PBS)。移植ガンは21日目に外科的に切除した。メラノーマ移植後35日目にマウスを屠殺、解剖し、肺に転移したガンのコロニー数を計測して対照のPBS投与群と比較した。その結果を以下の表2に示す。

【0056】

【表2】

本発明のペプチド誘導体の癌転移抑制作用について、悪性リンパ腫細胞であるL5178Y ML25 T-lymphomaを用いて実験的転移モデル系により検討した。実施例に記載した本発明の化合物1～3と、比較化合物としてフィブロネクチンの接着コア配列ペプチドであるArg-Gly-Asp-Serを用いた。これらのペプチド各々1000  $\mu$ gとL5178Y ML25 T-lymphoma細胞(対数増殖期のもの $4 \times 10^4$ 個)を各々PBS中で混合し、これを1群5匹のCDF1 (BALB/C×DBA/2)の雌マウスに尾静脈注射により投与した。投与後14日目にマウスを屠殺、解剖してマウスの肝臓及び脾臓の重量を測定し、対照のPBS投与群と比較した。その結果を以下に示す。

【0059】

【表3】

21		22
リンパ腫細胞未投与	1.11±0.15	0.09±0.01

\*\*\* t-検定で未処理区と比較して P(0.001)

【0060】この結果によれば、本発明の化合物1から3の投与によって、肝臓及び脾臓の重量はリンパ腫細胞未投与区のそれとほぼ同程度となった。すなわち本発明の化合物は、悪性リンパ腫細胞であるL5178Y ML25 T-lymphomaの肝臓や脾臓への転移に対しても抑制効果を示すことが明らかとなった。これに対し既存のフィブロネクチンの接着コア配列ペプチドであるArg-Gly-Asp-Serは、L5178Y ML25 T-lymphomaに対して転移抑制効果を示さなかった。

【0061】実施例7 結腸ガン細胞を用いた実験的肺転移モデル系によるガン転移阻害作用に関する検討  
本発明のペプチド誘導体のガン転移抑制作用について、\*

表4

投与化合物	肺への転移数	
	平均±SD	(範囲)
PBS (未処理)	219±28	(180-250)
Arg-Gly-Asp-Ser	241±54	(141-285)
化合物2	41±25	(14-74)**

\*\* t-検定で未処理区と比較して P(0.001)

【0063】この結果によれば、本発明の化合物2は結腸ガン細胞であるcolon26の肺への転移に対しても抑制効果を示すことが明かとなった。これに対し既存のフィブロネクチンの接着コア配列ペプチドであるArg-Gly-Asp-Serは、colon26に対して転移抑制効果を示さなかった。

【0064】実施例8 メラノーマ細胞を用いた実験的肺転移モデル系における延命作用に関する検討  
本発明のペプチド誘導体の延命作用について、制ガン剤との併用で実験的肺転移モデル系によって検討した。実施例に記載した本発明の化合物3と、制ガン剤として市販のアドリアマイシン（協和発酵工業社製アドリアシン注）を用いた。1000μgの本発明の化合物3と非常に転移性の強いガン細胞であるB16-BL6メラノーマ細胞（対数増殖期のもの5×10<sup>4</sup>個）を各々PBS中で混合し、これを1群10匹のC57BL/6の雌マウスに尾静脈注射により投与した。投与後5、6日目にアドリアマイシンを各々1回ずつ計2回（1回あたり100μg/200μl PBS）尾静脈注射により投与した。この実験を行った群をA区とする。一方、本発明の化合物3のみを最初に投与しアドリアマイシン投与を行わなかった群をB区、本発明の化合物3を投与せずアドリアマイシン投与のみを行った群をC区、未処理区としてPBSのみを投与した群をD区とする。そのまま飼育を続け、マウスの生存数の経時変化を記録した。延命効果の検定はマン-ウィットニーのu

\* 結腸ガン細胞であるcolon26を用いて実験的肺転移モデル系により検討した。実施例に記載した本発明の化合物2と、比較例としてフィブロネクチンの接着コア配列ペプチドであるArg-Gly-Asp-Serを用いた。これらのペプチド各々1000μgとcolon26/3.1細胞（対数増殖期のもの4×10<sup>4</sup>個）を各々PBS中で混合し、これを1群5匹のBALB/cの雌マウスに尾静脈注射により投与した。投与後14日目にマウスを屠殺、解剖し、肺に転移したガンのコロニー数を計測して対照のPBS投与群と比較した。その結果を以下の表3に示す。

【0062】

【表4】

テストにより行った。結果を添付の図1に示す。

【0065】図1において、グラフの横軸はメラノーマ移植後の日数、縦軸はマウスの生存数を示す。なお死亡したマウスを解剖して調べたところ、肺に転移したガンのコロニーが認められた。この結果によれば、本発明の化合物3を投与したB区は、PBSのみを投与したD区と比較して有意な延命効果を示した。さらに本発明の化合物3とアドリアマイシンを併用したA区には、本発明の化合物3のみを投与したB区、アドリアマイシンのみを投与したC区、PBSのみを投与したD区いずれと比較しても顕著な延命効果が認められた。

【0066】以上実施例により本発明を特定の例に関して説明したが、限定して解釈されるべきではない。本発明の本質及び範囲から逸脱しない種々の変更や修正が可能であることは明らかである。そしてそのような発明は本発明に含まれると考える。

【0067】

【発明の効果】以上説明したように本発明のペプチド誘導体は細胞接着性蛋白質であるフィブロネクチンのコア配列と比較して細胞接着性が大きく、ガン転移抑制作用等の種々の生物活性を十分に保持し、毒性の問題もほとんど無い。またメラノーマ細胞のみならず結腸ガン細胞、悪性リンパ腫細胞に対してもガン転移抑制効果を示し、さらにより現実的な病態治療モデルである自然肺転移抑制試験においてもガン転移抑制作用を示す。またそ

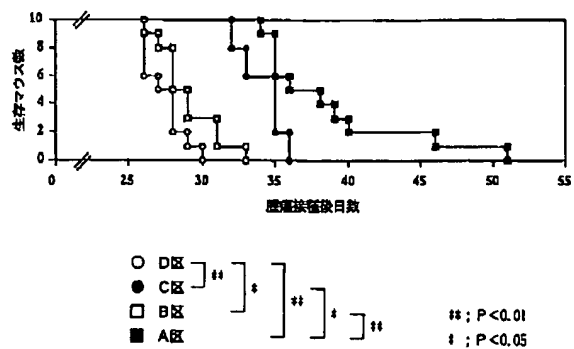
の構造は単純であるため合成も容易であり、医薬として  
価値の高いものである。

【図面の簡単な説明】

【0068】

【図1】 図1は本発明の化合物とアドリアマイシンを  
用いて行ったガン接種マウスの延命効果の検定の結果を  
示すグラフである。

【図1】



フロントページの続き

(72)発明者 済木 育夫

北海道札幌市厚別区厚別北3条西5丁目12

- 6

(72)発明者 東 市郎

北海道札幌市南区真駒内上町5丁目3-2

DIALOG(R)File 352:Derwent WPI  
(c) 2004 Thomson Derwent. All rts. reserv.

010118025 \*\*Image available\*\*

WPI Acc No: 1995-019276/199503

XRAM Acc No: C95-008781

Peptide deriv. comprising several copies of the sequence Arg-Gly-Asp -  
covalently bonded to organic molecule, useful as cancer metastasis  
inhibitor

Patent Assignee: FUJI PHOTO FILM CO LTD (FUJF )

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 6306096	A	19941101	JP 949893	A	19940131	199503 B

Priority Applications (No Type Date): JP 9338677 A 19930226

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan Pg	Main IPC	Filing Notes
JP 6306096	A	13	C07K-005/10	

Abstract (Basic): JP 6306096 A

A new peptide deriv. (or its salts) is a cpd. prepd. by covalently combining a peptide having the sequence Arg-Gly-Asp (I) as the constitutional unit with a proper organic molecule and contains a defined number of copies of (I) in one molecule. Also claimed is a cancer metastasis inhibitor contg. the above peptide deriv. (or its salt) as the active component.

USE/ADVANTAGE - The deriv. has a higher cell adhesion than the core sequence of fibronectin and has various bioactivities such as cancer metastasis inhibiting activity and shows substantially no toxicity.

Title Terms: PEPTIDE; DERIVATIVE; COMPRISE; COPY; SEQUENCE; COVALENT; BOND;  
ORGANIC; MOLECULAR; USEFUL; CANCER; METASTASIS; INHIBIT

Derwent Class: B04

International Patent Class (Main): C07K-005/10

International Patent Class (Additional): A61K-037/02; C07K-007/06;

C07K-099-00

File Segment: CPI

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**